

원저

봉약침의 LD₅₀ 변화 보고

권기록* · 장성봉* · 최영권*

* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

Report on the changes of LD₅₀ of Bee venom Herbal Acupuncture

Ki Rok Kwon* · Seong Bong Jang* · Young Kwon Choi*

* Department of Acupuncture & Moxibution, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

Abstract

Objectives : This experiment was conducted to reevaluate LD₅₀ of Korean bee venom acupuncture as many changes have occurred over the years.

Methods : ICR mice were used as the experiment animals and bee venom acupuncture was manufactured under the protocols of Korean Institute of herbal Acupuncture. Based on the previous reports, experiment was divided into pre and main sections.

Results

1. Presumed LD₅₀ value is at 5.25mg/kg.
2. Deaths of experiment animals occurred within 48 hours.
3. Reduced toxicity of the bee venom acupuncture is likely to be the results of more refined manufacturing process and production.

Conclusion : Comparing with the values of the previous results, toxicity of the bee venom acupuncture showed significant changes and more accurate findings on LD₅₀ value must be accomplished to lead further studies on the bee venom acupuncture.

Key words : Bee Venom Herbal Acupuncture, LD₅₀, manufacturing process, toxin, venom

1. 서론

독성실험은 의약품 등의 시험물질 안정성 평가를 하기 위하여 중요한 기초 자료이며, 필수적이라 할 수 있다¹⁾.

독성연구의 주요목적은 신약의 안정성을 평가하여 임상적 용약의 안전을 확보하기 위해 시행하는 것으로, 독성실험은 크게 급성 독성실험(단회투여독성시험), 아 급성 독성실험(1개월 반복투여 독성시험), 그리고 만성 독성실험(3개월 이상 반복투여 독성시험)으로 나눈다²⁾. 이 중, 급성독성실험은 신화학물질에 대해 제일 먼저 시행하는 독성시험으로 실험동물에 검체를 비교적 대량으로 1회 투여하여 중독량, 치사량, 중독현상 및 다른 연구를 하기위한 용량범위를 조사하는 실험이다.

※ 교신저자 : 권기록, 상지대학교 한의과대학 침구학교실
(Tel : 033-738-7503, E-mail : beevenom@paran.com)

급성독성실험 중 LD₅₀은 50% 치사량 측정을 말하는 것으로 검체를 실험동물에 투여하였을 때 실험동물의 절반이 죽는 검체투여량을 말한다³⁾. 약재의 독성을 평가하는데 중요한 기준으로 사용되고 경구투여시에는 14일, 주사시에는 7일간 관찰하는 것이 보통이다.

현재 임상에 사용되고 있는 다양한 약침제제들은 독성이 거의 없다고 보고되어 있으나 벌의 독을 치료에 사용하고 있는 봉약침은 독성이 매우 강한 것으로 알려져 있다. 한국산 봉약침의 LD₅₀은 0.17-1.5mg/kg으로 보고된 바 있고^{4,5)}, 만모스 통증연구소에서 시행한 실험에서는 3.0mg/kg으로 보고하여⁶⁾ 큰 차이를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이에 저자는 그동안 대한약침학회의 지원을 바탕으로 봉독의 채취 및 봉약침의 조제 방법을 표준화하기 위하여 장기간 연구를 진행하여 왔고, 그 과정에서 독의 채취, 조제과정의 표준화 등 다양한 변화가 발생하였으며, 또한 10년 이상의 시간이 경과하였기에 보다 정확한 한국산 봉약침의 LD₅₀을 평가하고자 본 연구를 시행한 결과 큰 변화가 있었음을 알게 되어 이에 보고하는 바이다.

II. 방 법

1. 동물 및 재료

1) 동물

봉약침의 LD₅₀을 관찰하기 위하여 체중 20±3g 내외의 ICR계 웅성 mouse를 실험에 사용하였다. 모든 동물은 중앙실험동물센터에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 예비실험으로 3마리를 한 군으로 하여 이전에 보고된 봉약침의 LD₅₀값인 0.17mg/kg을 기준으로 0.15mg/kg부터 점차 용량을 증량하면서 사망한 쥐가 발생하는 용량을 찾은 후 다시 10마리를 한 군으로 하여 정확한 봉약침의 LD₅₀을 찾았다.

2) 재료

① 봉약침의 조제

실험에 사용한 봉독은 전기자극용 봉독채취기(Bee Venom Collector -BVC)를 사용하여 채취한 것으로 정제

과정을 거친 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 동결 건조된 분말봉독을 조제지침에 의거하여⁸⁾ 10mg/ml의 고농도로 3차 증류수에 희석한 후, pH 및 전해질 balance를 조절하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

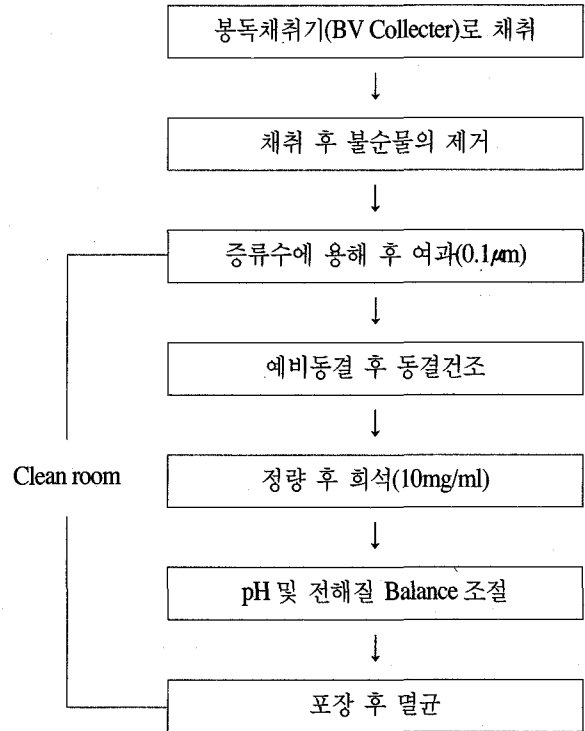


Fig. 1 Manufacturing process of Bee Venom. Herbal Acupuncture

② 주사기

30 gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였고, Injection Volume을 체중×18.75µl로 하여 정량으로 mouse의 복강 내에 주입하였다.

III. 결 과

1. 예비실험

LD₅₀을 측정하기 위하여 Injection Volume을 체중×18.75µl로 하여 정량으로 mouse의 복강 내에 농도별로 주입하여 일주일간 사망유무를 관찰하였다. 그 결과 사망한 개체가 4.5mg/kg에서부터 발생하였다(Table 1.).

따라서 봉약침의 LD₅₀은 4.5-6.0mg/kg에 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Mortality of mice treated with Bee Venom

Dose of Bee Venom(mg/kg)	Hours after treatment				Final Mortality	Survival Rate(%)
	24	48	72	168		
0.15(3)*	0	0	0	0	0/3	100
0.20(3)	0	0	0	0	0/3	100
0.30(3)	0	0	0	0	0/3	100
0.50(3)	0	0	0	0	0/3	100
1.0(3)	0	0	0	0	0/3	100
2.0(3)	0	0	0	0	0/3	100
3.0(3)	0	0	0	0	0/3	100
4.5(3)	1	1	1	1	1/3	66.7
6.0(3)	2	2	2	2	2/3	33.3

* : Number of Animal

2. 본 실험

본 실험에서는 개체 수를 10마리로 하여 진행하였다. 주입용량은 예비실험에서 사망한 개체가 발생하지 않은 최고 단위인 3.0mg/kg에서부터 1.5mg/kg씩 단계별로 증량하여 예비 실험에서 채택하지 않았던 고용량인 7.5mg/kg까지 시행하였다. 그 결과 봉약침의 LD₅₀은 5.25mg/kg 내외임을 알 수 있었다(Table 2., Fig. 2).

Table 2. Mortality of mice treated with Bee Venom

Dose of Bee Venom(mg/kg)	Hours after treatment				Final Mortality	Survival Rate(%)
	24	48	72	168		
3.0(10*)	0	0	0	0	0/10	100
4.5(10)	1	3	3	3	3/10	70.0
6.0(10)	5	7	7	7	7/10	30.0
7.5(10)	5	7	7	7	7/10	30.0

* : Number of Animal

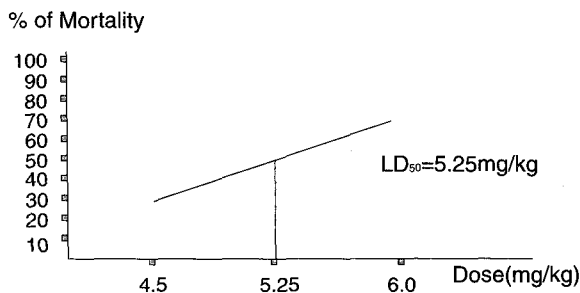


Fig. 2 LD₅₀ of Bee Venom Herbal Acupuncture

IV. 고 찰

봉약침요법은 자연상태의 벌독(Venom of *Apis mellifera*)을 인위적으로 채취하여 가공한 후 변증에 의해 선택되어진 경혈이나 질병유관부위에 적정량 주입하여 질병을 치료하는 방법으로 현재 한국 한의학계에서 폭 넓게 사용되고 있는 신침요법이다. 봉약침요법이 기존의 일반 치료법과 차별화되는 부분은 자연계의 동물성 독을 순수하게 이용한다는 것과 벌이 봉군과 종족을 위협으로부터 보호하기 위하여 최후의 방어수단인 침과 독을 사용하는 것을 침구학과 결합시켜 새로운 치료기술로 발전시켰다는 것이다.

독(poison, toxin, toxicant)이란 “여러가지 경로를 통해서 소량이 생체 내에 들어왔을 때 생체조직에 기능적, 혹은 형태적으로 장애를 주거나 치사작용을 일으키는 물질”이라고 정의하고 있다³⁾. 따라서 독은 극히 미량으로도 그 독성의 강도에 따라 다양한 문제를 야기시킬 수 있고, 이로 인한 위험성에 적절히 대처하기 위하여 동물독성실험을 시행한다.

이 중, 급성독성실험은 신물질에 대해 제일 먼저 시행하는 독성시험으로 실험동물에 검체를 비교적 대량으로 1회 투여하여 중독량, 치사량, 중독현상 및 다른 연구를 하기위한 용량범위를 조사하는 실험이다.

급성독성실험 중 LD₅₀은 50% 치사량 측정을 말하는데, 검체를 실험동물에 투여하였을 때 실험동물의 절반이 죽을 수 있다고 기대되는 통계적으로 노출된 어떤 물질의 단일용량을 말한다. 약재의 독성을 평가하는데 중요한 기준으로 15g/kg이하이면 실제 무독성, 5-15g/kg이면 근소 독성, 0.5-5g/kg은 중등도 독성, 50-500mg/kg은 상당히 강한 독성, 5-50mg/kg은 맹독성, 5mg/kg이하이면 초 맹독성으로 분류하고 있다.

이전의 실험에서 봉독의 LD₅₀은 0.17-1.5mg/kg으로 다양하게 보고되어 있다⁴⁾. 이는 상기한 독성분류에 의하면 초 맹독성에 해당되고 김의 봉독의 LD₅₀ 보고인 3.0mg/kg 역시 동일한 분류에 포함될 수 있다.

이러한 보고가 이루어진 시점에서 이미 10여년 이상의 세월이 경과하였고, 그동안 봉약침의 생산기술이나 조제과정에 많은 변화가 있었다. 이전 실험에 사용된 봉독은 최⁵⁾가 고안한 봉독채취기(전자파 자극법)로 수집한 건조 봉독을 증류수나 생리식염수에 녹인 후 0.2 μ m 여과 방법으로 정제하여 사용하였으나, 현재 임상上使用되고 있는 봉약침은 미세전류 자극방식인 Bee Venom

Collector에서 채취한 후 정제 방법을 한층 강화하였고, 외부 감염을 막기 위하여 무균실에서 조제과정을 시행하고 있다⁹⁾. 또한 인체의 흡수도를 높이기 위하여 pH를 중성으로(pH 7.2), 전해질을 등장액으로(0.9% NaCl) 조절하는 과정을 권장하고 있다. 따라서 현재 권장하고 있는 이와 같은 조제방법에 따른 봉약침의 LD₅₀을 재평가하기 위하여 이전의 연구보고를 바탕으로 3마리의 mouse를 한 군으로 하여 예비실험을 시행하였다. 이전 연구에서 보고된 봉독의 LD₅₀인 0.17mg/kg⁶⁾과 0.2mg/kg⁵⁾ 그리고 1.5mg/kg⁶⁾을 바탕으로 사망하는 개체를 찾기 위하여 0.15mg/kg부터 점차 증량하면서 실험군을 관찰하였다. 그 결과 4.5mg/kg에서 처음 사망하는 개체가 발생함을 알 수 있었다(Table 1.). 보다 정밀한 평가를 위하여 10마리의 mouse를 한 군으로 사망한 개체가 발생한 4.5mg/kg부터 7.5mg/kg까지 각 군 간의 간격을 1.5mg/kg으로 하여 본 실험을 진행하였다. 그 결과 정확한 LD₅₀을 밝히지는 못하였으나 봉약침의 추정 LD₅₀은 5.25mg/kg임을 알 수 있었다(Table 2., Fig. 2).

이는 이전의 연구결과에 비하여 독성이 적게는 1/3, 많게는 1/30가량 약화된 양임을 알 수 있다. 저자는 이전의 연구보고에서 전기자극법이나 전자파 자극법 모두 거의 동일한 성분 조성을 나타내고 있음을 보고한 바 있다¹⁰⁾. 따라서 추출방식의 변화는 독성을 약화시키는 충분한 조건이 될 수 없다고 여겨진다. 이러한 큰 변화의 이유는 아마도 독의 순수정제 기술이 발달하였다는 것과, pH와 전해질 조절과정이 독성을 상당히 약화시키지 않았는가 하는 것을 생각해 볼 수 있었다. pH는 용액 중에 존재하는 수소이온의 농도를 말하는데¹¹⁾ 자연상태의 봉독은 5.2-5.6의 산성을 띄고 있다¹²⁾. 인체의 체액은 중성에 가깝게 구성되어 있고, 현재 학회의 권장사항도 중성을 유지하게 하고 있다. 또한 체액과 같은 삼투압을 유지하기 위하여 NaCl로 등장 조절을 하는 것도 주요한 인자로 생각된다. 이는 인체에 주입되었을 때 삼투압의 차이로 발생하는 조직의 용혈작용을 줄여주어 통증을 완화시키는 것으로 보고 있는데, 이전의 약침에서는 이와 같은 조제 지침이 없이 사용되었으므로 과다한 통증에 의한 사망 증가가 현재의 봉약침과 현저한 차이를 나타내는 중요한 원인으로 작용하지 않았을까 추정된다.

향후의 봉약침과 관련된 지속적인 연구를 위해서도 보다 정확한 봉약침의 LD₅₀ 값이 제시되어야 할 것으로 여겨진다.

V. 結 論

예비실험과 본 실험을 통하여 봉약침의 LD₅₀을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉약침의 추정 LD₅₀은 5.25mg/kg임을 알 수 있었다.
2. 실험동물의 사망은 48시간 이내에 이루어짐을 알 수 있었다.
3. 이전의 보고에 비하여 봉약침의 독성이 약화된 이유는 정제기술의 발달과 조제방법의 변화가 주요 원인으로 추정되었다.

參考文獻

1. 김양강, 독성학, 동화기술, 서울, 15-18, 1994.
2. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제98-116호, 1988.
3. 허인회 외, 독성학, 신일상사, 37, 1993.
4. 고형균, 봉침독요법이 항염, 진통 및 해열에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한한의학회지 Vol. 13, No. 1, 290, 1992.
5. 이종석 외, 봉독의 치사량에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지, 10권 1호, 151-157, 1993.
6. 이종석, 고형균, 김창환, 약침용봉독액의 급성독성에 관한 연구, 대한침구학회지, 11 : 1, 177-191, 1994.
7. 김문호, 봉독요법과 봉침요법, 서울, 한국교육기획, 104-105, 1992.
8. 대한약침학회, 약침요법 시술 지침서, 대한약침학회, 서울, 133-135, 1999.
9. 최대봉, 양봉협회보, 한국양봉협회, 1988. 12.
10. 강대인, 권기록, A report on the manufacturing process of Korean Herbal Acupuncture prepared with KGMP, 대한약침학회지, 4 : 1, 87-101, 2001.
11. 이진선, 권기록, 최호영, HPLC를 이용한 봉약침의 주요 성분 관련 연구, 대한침구학회지, 17 : 4 120-129, 2000.
12. 이정수, 인체 생리학, 도서출판 정담, 46-49, 1994.
13. 최승윤, 양봉 꿀벌과 벌통, 오성출판사, 350, 1987.